

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 沼 幸作

### 論文題目

Mitochondria as a Platform for Dictating the Cell Fate of Cultured Human Corneal Endothelial Cells

### 論文内容の要旨

角膜内皮細胞は角膜前房側の最内層に存在する単細胞層で、六角形の細胞がモザイクパターンに配列している。通常、*in vivo*の状態では細胞増殖を行うことができないので生下時の細胞数より増加することはない。よって病的もしくは外的要因にて角膜内皮細胞が脱落すると、周囲の細胞が拡大・伸展して補償する。角膜内皮細胞は角膜透明性維持のために重要な作用を担い、角膜実質に水分が浸透するのを制限するバリア機能と、水分を前房側へ汲み出すポンプ機能の2つの機能を有する。細胞数が減少することによってこの機能が障害されると、角膜実質に水分が貯留し角膜浮腫を起こし、角膜透明性が低下し罹患者は視力低下をきたす。不可逆的な角膜内皮代償不全となると恒久的な角膜浮腫を生じ水疱性角膜症と呼ばれる状態に至る。

難治性疾患の新たな再生医療として細胞治療が様々な領域で注目されている。我々はこれまで難しいとされてきたヒト角膜内皮細胞の*in vitro*で培養し、培養ヒト角膜内皮細胞を眼内に注入する細胞注入治療を開発した。これまで角膜移植しか方法がなかった水疱性角膜症に対して細胞注入療法の臨床研究と治験を行い、その臨床成果を報告してきた。

一方で角膜内皮細胞は人体でも有数のミトコンドリアを豊富に内含する細胞として知られているが、どのようにして環境基質から代謝エネルギーを生成し利用しているのかは不明である。我々は角膜内皮代償不全の根底にある病態を理解することを目的に研究を行っており、今回新たな知見を得たので報告する。

またヒト角膜内皮細胞は培養を行うと、異なる分化成熟度の細胞がまだらに集団を形成することがわかっており、我々はこれを亜集団 Sub Populations (SPs) と名付けた。SPsの評価方法として、フローサイトメトリーを用いて分化クラスター Cluster Designation (CD) マーカーで規定された、エフェクター細胞の割合 (E-ratio) を求めた。CD44+/CD166+ CD133- CD105- CD24- CD26-の細胞表面マーカーの組み合わせを持つ成熟分化した培養ヒト角膜内皮細胞の SPs (mature SPs) をエフェクター細胞と定義した。そして、CD マーカーのこの組み合わせプロファイルを持たない培養ヒト角膜内皮細胞を含む SPs をすべて cell-state-transition(CST) SPs と定義した。これまでの臨床研究から細胞注入治療において臨床的に有用な成果を得るためには、エフェクター細胞の割合、すなわち E-ratio は 90%以上であることが望ましい。

この研究では、ドナーヒト角膜から採取した角膜内皮細胞を*in vitro*で培養した mature SPs および CST SPs と *ex vivo*のヒト角膜内皮組織を対象にした。細胞外フラックスアナライザー (XFe24; Agilent Technologies; Santa Clara, CA) を使用して、ミトコンドリアの呼吸能を mito stress test および mito fuel flex test assay で調べ酸素消費率 Oxygen Consumption Rate (OCR) を評価した。トリカルボン酸 (TCA) サイクルおよびアセチル CoA 関連の代謝酵素に対して液体クロマトグラフィータンデム質量分析法によるプロテオーム解析を行った。

結果、*in vitro* では mature SPs の最大 OCR は CST SPs よりも有意に高く、*ex vivo*では健常ドナー組織の最大 OCR が角膜内皮代償不全をきたしたドナー組織よりも有意に高かった。*ex vivo*においてドナー年齢差による最大 OCR の有意な差は認めなかった。mature SPs は継代から日数が経過するごとに徐々に最大 OCR が低下し 5 週間で安定化した、最大 OCR は培養時の添加化合物によって大きな影響を受けた。すなわち EGF、SB431543 によって最大 OCR は有意に抑制され、Rho 関連プロテインキナーゼ阻害剤 Y-27632 によって有意に増大した。呼吸の 3 大基質であるグルコース、アミノ酸、脂肪酸の代謝依存性は、SPs によって様々なプロファイルを示した。特に CST SPs は mature SPs と比較して不均一であったが、代表的な mature SPs は、CST SPs よりもグルコース依存性が高い一方で、CST SPs は代謝基質としてグルタミンと脂肪酸に依存している傾向があり、よりアナプレロティックな傾向を示した。

プロテオーム解析ではピルビン酸の代謝経路を決定する酵素の発現に違いが見られ、mature SPs ではピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの発現が増加し、CST SPs では乳酸 LDH の発現が増加していた。TCA サイクルに関与する酵素であるリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)1、アコニターゼ(ACO)1、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)1 は CST SPs で発現が増加したが、MDH 2、ACO2、IDH2 は mature SPs で選択的に発現が増加した。また、アセチル CoA に関連する酵素の発現もこれとは対照的であり、アセチル CoA 合成酵素短鎖 1 (ACSS1) は mature SPs で選択的に発現が増加したのに対し、CST SPs では ATP-クエン酸リアーゼと ACSS2 が選択的に発現増加を認めた。

本研究によりヒト角膜内皮細胞の細胞状態にはミトコンドリアが深く関与していることが示唆された。さらに、アセチル CoA を中心とするミトコンドリアの中間代謝物はエビジェネティックに角膜内皮細胞の運命と機能に関連している可能性が示唆された。また、細胞外フラックス分析が、培養ヒト角膜内皮細胞の SPs を機能的評価するための新しいツールになりうることを見出した。